

**Strahleninduzierter Abbau der Aminosäure-
reste von Lactatdehydrogenase in
wäßriger Lösung**

von

Reinhard Matthäus Offfinger

aus

Augsburg



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546221_0019

Aus dem Institut für Radiologie
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. med., Dr. phil. nat. H. Pauly

Strahleninduzierter Abbau der Aminosäure- reste von Lactatdehydrogenase in wäßriger Lösung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Reinhard Matthäus Offinger
aus
Augsburg

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereiches Medizin
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. E. Rügheimer

Referent: Prof. Dr. Dr. H. Pauly

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Juli 1976

Meinen Eltern
aus Dankbarkeit
gewidmet





Inhaltsübersicht

1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Methodischer Teil	6
2.1. Einleitung zum methodischen Teil	6
2.2. Materialien und Geräte	6
2.2.1. Materialien	6
2.2.2. Geräte	7
2.3. Sterile Arbeitsbedingungen	8
2.4. Vorbereitung des Enzympräparates zur Bestrahlung	9
2.5. Messung des Proteingehaltes	10
2.6. Bestrahlung	11
2.6.1. Art der Strahlung und Dosisleistung	11
2.6.2. Bau des Probengefäßes	12
2.6.3. Bestrahlungsbedingungen	12
2.7. Aktivitätsmessung	13
2.7.1. Prinzip	13
2.7.2. Durchführung	14
2.7.3. Auswertung	15
2.8. Umpuffern und Gefriertrocknen	16
2.9. Aminosäurenanalyse	17
2.9.1. Aufbereitung des Enzyms	17
2.9.2. Analysenbedingungen	18
2.9.3. Auswertung und Berechnung	22

3. Ergebnisse	24
3.1. Dosiseffektkurven	24
3.2. Aminosäureanalysen	26
4. Diskussion	31
5. Zusammenfassung	48
6. Literaturverzeichnis	49

1. Einleitung und Problemstellung

Nachdem 1895 RONTGEN und 1896 BECQUEREL die Entdeckung der ionisierenden Strahlen gelang, wurden kurze Zeit später Beobachtungen über die biologische Wirkung dieser Strahlen gemacht. Bereits 1899 wurden ionisierende Strahlen bei der Therapie des Hautkrebses angewendet und 3 Jahre später dann auch die cancerogene Wirkung von Röntgenstrahlen auf die Haut entdeckt. Seither wurde versucht, die Wirkungsweise ionisierender Strahlen genau zu untersuchen. Anfangs war dies nur durch Beobachtung der biologischen Wirkung möglich, mit Fortschreiten der physikalischen und chemischen Untersuchungsmethoden gelang es dann auch, Aussagen über die physikalische und chemische Strahlenwirkung zu machen. Da wegen der Vielfalt der ablaufenden Prozesse an einem ganzen Organismus oder einer Körperzelle die Untersuchungen sehr schwierig waren, versuchte man, diese Vorgänge an weniger komplizierten Modellen zu studieren. Dabei griff man meist auf Proteine zurück, die als eine der wichtigsten Bausteine der Zelle großes Interesse fanden. Als es um 1960 gelang, einige Enzyme wie Ribonuclease, Chymotrypsin, Trypsin und Lactatdehydrogenase zu isolieren und in hochgereinigtem Zustand darzustellen, wurden mit ihnen Bestrahlungsversuche unternommen, da es bei Enzymen verhältnismäßig leicht war, strahleninduzierte biologische Veränderungen mit Hilfe der enzymatischen Aktivität zu messen.

Ribonuclease und Lyozym wurden bezüglich strahlen-induzierter Veränderungen bereits mehrfach untersucht. (1,2,3,4,5) In der vorliegenden Arbeit sollen Veränderungen an Lactatdehydrogenase durch Röntgenstrahlen untersucht werden.

Lactatdehydrogenase unterscheidet sich von den vorgenannten Enzymen Ribonuclease und Lyozym in folgenden Punkten:

- Das Molekulargewicht von Lactatdehydrogenase ist mit 142.000 etwa um das 10fache höher als das von Ribonuclease (14.000) (6,7)
- Lactatdehydrogenase besteht aus 4 Untereinheiten vom Molekulargewicht 36.000. Es existieren 2 verschiedene Monomere in Form von 2 Polypeptidketten unterschiedlicher Primärstruktur. (6,7)
- Lactatdehydrogenase besitzt keine Disulfidbrücken, sondern 22 SH-Gruppen. (8)
- Die Aminosäuresequenz ist teilweise aufgeklärt. (9)
- Nach ADAMS M.J. (10) soll die Untereinheit der Lactatdehydrogenase aus 311 Aminosäureresten bestehen und bis auf 20 Aminosäurereste am N-terminalen Ende globuläre Struktur aufweisen. Davon sollen etwa 24% auf α -Helices und 10-15% auf β -Strukturen entfallen.
- Die enzymatisch aktive Einheit ist das tetramere Molekül. (11,12)

Um strahleninduzierte biologische Wirkungen erklären zu können, war es notwendig, sich die Frage nach den physi-

kalischen und chemischen Reaktionen bei der Einwirkung ionisierender Strahlen zu stellen. Bereits 1927 entdeckte FRICKE (13) bei Untersuchungen mit Hämoglobin einen Unterschied in der Strahlenwirkung auf Stoffe in trockenem Zustand und in wäßriger Lösung. DALE und Mitarbeiter (14,15,16,17) bestätigten 1942-1954 die Entdeckung FRICKE's und trugen mit ihren Arbeiten zur Prägnung des Begriffes "Indirekte Strahlenwirkung" bei. Bei Bestrahlung von Stoffen in wäßriger Lösung - wie es der biologischen Situation entspricht - fand man, daß die strahlenbedingten Veränderungen von der Konzentration des gelösten Stoffes und vom Zusatz weiterer Stoffe zur Lösung abhängen. Die Strahlen mußten nicht direkt am Substratmolekül angreifen, sondern über den Umweg des Wassermoleküls, das durch Strahlung aktiviert und irgendwie mit dem gelösten Substratmolekül reagierte. Über die Radiolyse des Wassers und ihre Produkte war noch nichts genaues bekannt.

1934 postulierten HABER und WEISS (18) die Existenz des freien $\text{OH}^\bullet$ -Radikals in wäßriger Lösung als kurzlebiges Zwischenprodukt der photochemischen und katalytischen Zersetzung des Wasserstoffperoxids. WEISS erkannte 1944 (19) und 1946 (20), daß bei der Radiolyse des Wassers $\text{OH}^\bullet$ -Radikale nach folgender Gleichung auftreten:



1960 postulierte WEISS (21) dann auch das Auftreten von Elektronen bei der Wasserradiolyse. 1962 gelang HART

und BOAG (22) und 1963 KEENE (23) der eindeutige Nachweis hydratisierter Elektronen durch Entdeckung des Absorptionsspektrums des hydratisierten Elektrons bei der Pulsradiolyse des Wassers. Man nimmt heute an, daß bei der Radiolyse des Wassers $\text{OH}^\bullet$, $\text{H}^\bullet$ und hydratisierte Elektronen entstehen, die dann mit der gelösten Substanz reagieren.

Um die Wirkung von Radikalen einer Art zu untersuchen, war es notwendig, die anderen durch geeignete Methoden abzufangen. Bereits 1938 haben FRICKE, HART und SMITH (24) Schutzeffekte an Mischungen verschiedener einfacher organischer Stoffe in Wasser untersucht. 1942 haben DALE (25) und 1949 DALE, GRAY und MEREDITH (16) die Wirkung von Zusätzen auf die Desaktivierung von Enzymen in wäßriger Lösung erforscht.

Seit etwa 1960 hat man durch die Pulsradiolyse eine Methode, die es ermöglicht, Reaktionsgeschwindigkeiten der Wasserradikale mit den gelösten Stoffen zu messen. So kennt man heute die Geschwindigkeitskonstanten zahlreicher Reaktionen von Wasserradikalen mit Proteinen oder Aminosäuren. Durch die Pulsradiolyse war es auch möglich, Substanzen zu finden, die besonders schnell mit einem der Primärradikale reagieren. Setzt man eine solche Substanz einer Proteinklösung zu, so können Radikale an der Reaktion mit dem Protein gehindert werden.

Untersuchungen, bei denen mit Hilfe solcher Fängersubstanzen die Wirkung einer Radikalsorte auf ein Enzym

untersucht wurden, sind z.B. an Lysozym von ADAMS und Mitarbeitern (1) und an Ribonuclease ebenfalls von ADAMS und Mitarbeitern (2), sowie von MEE, ADLSTEIN und STEIN (4) und von SCHÜSSLER (5) durchgeführt worden. Aufgabe der vorliegenden Arbeit soll es sein, durch Anwendung bestimmter Fängersubstanzen die Wirkung einzelner Radikalsorten auf die enzymatische Aktivität sowie auf die Aminosäurezusammensetzung der Lactatdehydrogenase zu untersuchen.

2. Methodischer Teil

2.1. Einleitung zum methodischen Teil

Der folgende methodische Teil gibt zuerst eine Übersicht über die verwendeten Materialien und Geräte sowie allgemeine Labormethoden. Dann richtet er sich in seiner Gliederung nach dem chronologischen Ablauf einer Versuchsreihe.

2.2. Materialien und Geräte

2.2.1. Materialien

Folgende Materialien und Chemikalien wurden verwendet:

- Laktatdehydrogenase aus Kaninchenskelettmuskel als Kristallsuspension in 2,2 M Ammoniumsulfatlösung der Fa. Boehringer, Mannheim. Fremdaktivitäten anderer Enzyme bezogen auf die spezifische Aktivität von LDH je kleiner als 0,01%.
- β -Nikotinamid-adenin-dinukleotid in reduzierter Form als di-Natriumsalz (80%ig), Reinheitsgrad I, der Fa. Boehringer, Mannheim.
- Pyruvat als mono-Natriumsalz der Fa. Boehringer, Mannheim.
- Ninhydrin, Reinheitsgrad p.a. der Fa. Serva, Heidelberg.
- Athylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz der Fa. Serva, Heidelberg.

- Sephadex G 25 fine, Dextrangel für die Gelchromatographie, der Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden.
- Bacto Agar und Nutrient Broth zur Herstellung von Bakteriennährböden der Fa. Difco Laboratories, Detroit, USA.
- Analytical grade cation exchange resin AG50W-X8, 50-100 mesh, hydrogen form der Fa. BIO-RAD, München zum Abfangen von NH_3 aus den Puffern für die Aminosäurenanalyse.
- Alle übrigen verwendeten Chemikalien wurden von der Fa. Merck, Darmstadt, im Reinheitsgrad p.a. bezogen.

2.2.2. Geräte

Folgende Geräte wurden benützt:

- Ionenfilter CAM 24 der Fa. Serva, Heidelberg.
- Leitfähigkeitsmesser DL 1 der Fa. Serva, Heidelberg.
- pH-Meter 27 der Fa. Radiometer Kopenhagen.
- YSI Model 42 SC Telethermometer der Fa. Yellow Springs, Yellow Springs, Ohio, USA.
- Elektrische Magnetrührgeräte JKA-Combimag der Fa. Janke und Kunkel, Staufen.
- Chromatographierohr aus Plexiglas (50 cm x 1,4 cm), nach Plan gefertigt von Herrn Lehmeier, Inst. f. Radiologie, Erlangen.
- Fraktionssammler Ultro-Rac 7000 der Fa. LKB-Produkter, Bromma, Schweden.
- Spektralphotometer PMQ-II der Fa. Carl Zeiss, Oberkochen.

- Quarz-Infrasil- und Quarz-Suprasil-Küvetten, Schichtlänge 1 cm der Fa. Hellma, Mülheim.
- Photometer Eppendorf mit temperierbarem Küvettenhalter der Fa. Eppendorf Gerätebau Netheler u. Hinz, Hamburg.
- Mikropipetten Marburg (0,01 ml - 1 ml) der Fa. Eppendorf Gerätebau Netheler und Hinz, Hamburg.
- Therapieröntgenröhre TR 300 f der Fa. Siemens, Bereich Medizinische Technik, Erlangen.
- Kälte-Thermostat Ultra Kryomat TK 30 der Fa. Wobser, Lauda.
- Automatischer Aminosäurenanalysator BC 200 der Fa. LKB, München, vormals Fa. BIOCAL, München.
- Tischrechner Calculator 9100 A der Fa. Hewlett Packard, Loveland, Colorado, USA.

2.3. Sterile Arbeitsbedingungen

Zur Herstellung der Puffer sowie der anderen notwendigen Lösungen wurde normales Leitungswasser mit dem Ionenaustauscher CAM 24 entionisiert (Leitfähigkeit kleiner als 0,1 μS) und anschließend doppelt quartzdestilliert. Die damit hergestellten Pufferlösungen und die Gelsuspension für das Umpuffern des Enzyms wurden sodann bei 120°C 20 Min. lang in überhitztem Wasserdampf autoklaviert. Sämtliche Gefäße, die mit dem Enzym oder Pufferlösungen Kontakt bekamen, wurden mit 70 Vol%igem iso-Propanol desinfiziert. Um Schwermetallionen möglichst zu ent-

fernen, wurden die Gefäße mit Äthylendiamintetraessigsäure in millimolarer Konzentration gespült.

Um drüber hinaus Bakterienwachstum zu verhindern, wurde die Säule mit dem Sephadex Gel im Kühlraum bei einer Temperatur von 4°C installiert und hier wurden auch die Enzymlösungen aufbewahrt.

2.4. Vorbereitung des Enzympräparates zur Bestrahlung

Das LDH-Präparat, wie es von der Fa. Boehringer bezogen wurde, lag als Kristallsuspension in 2,2M Ammoniumsulfatlösung vor. Es mußte vor Bestrahlung von seinem hohen Salzgehalt befreit und in den jeweiligen Bestrahlungspuffer übergeführt werden. Dies geschah durch Gelchromatographie über Sephadex G25 fine. Das Quellen des Dextrangels, das Packen der Säule sowie das Auftragen der Proben auf die Geloberfläche wurde nach den Empfehlungen von DETERMANN (26) und einer von der Herstellerfirma bezogenen Informationsschrift (27) durchgeführt.

Die Säule wurde zu Anfang und vor jedem Pufferwechsel mit 11 des jeweiligen Elutionspuffers vorgespült. Der Puffer wurde vor Gebrauch etwa 15 Min. lang mit der Wasserstrahlpumpe entgast, sofern dies wegen flüchtiger Zusätze nicht unmöglich war.

Zur Prüfung auf Keimfreiheit wurde vor jedem Versuch eine Probe des Säuleneluates auf eine Agarplatte aufgebracht und diese 24 Std. bei 37°C inkubiert. Zeigte sich Bakterien-

wachstum, wurde die Skülenpackung erneuert oder mit 0,02% Natriumazid gespült, bis ein neuer Inkubationstest negativ ausfiel.

Nach Auftragen der im Verhältnis 1:1 mit dem Elutionspuffer verdünnten Enzymkristallsuspension wurde das Eluat mit einem automatischen Fraktionssammler in Portionen von je 3 ml aufgefangen. Die einzelnen Fraktionen wurden mit Nessler's Reagens auf Anwesenheit von Ammoniumsulfat geprüft. Fiel der Test bei den proteinhaltigen Fraktionen negativ aus, wurden sie weiterverwendet.

2.5. Messung des Proteingehaltes

Der Proteingehalt der nach der Gelchromatographie erhaltenen und ammoniumsulfatfreien Fraktionen wurde durch Messung der UV-Absorption bei einer Schichtdicke von 1 cm und einer Wellenlänge des verwendeten Lichtes von 280 nm bestimmt. Da das verwendete LDH-Präparat zu 95% aus dem Isoenzym LDH-5 besteht (28,6), wurde für die Berechnung der Enzymkonzentration der von JAENICKE und KNOF (6) für eine 0,1%ige Lösung von LDH-5 gefundene Wert von 1,44 zugrunde gelegt. Die Messung wurde bei Zimmertemperatur durchgeführt. Als Nullwert wurde eine Vergleichsküvette mitgeführt, die mit dem jeweiligen Elutionspuffer gefüllt war.

Die gesuchte Enzymkonzentration ergab sich dann aus der Beziehung:

$$c = E_{280} / d \cdot \epsilon_{280}$$

wobei $d = 1 \text{ cm}$ und $\epsilon_{280} = 1,44 \text{ ml} / \text{mg} \cdot \text{cm}$ waren.

Durch Verdünnen der proteinreichsten Fraktionen wurde eine Lösung mit der Konzentration $c = 1 \text{ mg/ml}$ hergestellt und davon 10 ml für die Bestrahlung weiterverwendet.

2.6. Bestrahlung

2.6.1. Art der Strahlung und Dosisleistung

Zur Bestrahlung der Enzymlösungen wurde eine Röntgenröhre Stabilipan 300 der Fa. Siemens verwendet. Die Röhrenspannung betrug 200 kV, der Röhrenstrom 20 mA bei 2 mm Aluminiumfilterung. Der effektive Fokus befand sich im Abstand von 124 mm von der Probenoberfläche.

Zur Dosismessung wurde anstelle der Probe ein Plexiglasphantom verwendet, das in Schichtmitte ein Kondiometer enthielt. +)

Die damit gemessene Dosisleistung ergab für die ersten Bestrahlungsversuche 2230 rd/Min., nach Auswechseln der Röhre und erneuter Dosismessung bei den späteren Versuchen 2060 rd/Min.

Der Fehler, der durch die Entnahme einzelner Proben und des dadurch veränderten Probenabstandes entstand, wurde vernachlässigt. (Bei Entnahme von 12 Einzelproben à 50 μl war die Differenz des Abstandes der Probenoberfläche vom Fokus 0,6 mm ist gleich kleiner als 0,5% des Gesamtabstandes)

+) Die Dosismessung führten in dankenswerter Weise Herr Dr. Milbers und Herr Dr. Schmidt durch.

2.6.2. Bau des Probengefäßes

Bei der Bestrahlung befand sich die Enzymlösung in einem Quarztöpfchen, das in einen Kühlmantel aus Plexiglas eingebaut war. Der Durchmesser des Töpfchens war so bemessen, daß bei einem Probenvolumen von 10 ml die Schichtdicke 1 cm betrug (Durchmesser = 36 mm). Zur Entnahme von Proben und für die Zuleitung von Schutzgas waren Öffnungen vorhanden. Nach oben, zur Röhre hin, schloß eine Hostaphanfolie von 0,03 mm Dicke das Gefäß ab. Unter dem Kühlmantel befand sich ein 5 cm dicker Plexiglasblock, der ihn von dem darunter befindlichen Magnetprüfgerät trennte, um Rückstreuung zu verhindern.

2.6.3. Bestrahlungsbedingungen

Jeweils 10 ml einer Enzymlösung von der Konzentration 1 mg/ml wurde in dem Quarztöpfchen bestrahlt. Mit Hilfe eines Kryostaten wurde die Kühlflüssigkeit und die Enzymlösung auf einer konstanten Temperatur von 1,5°C gehalten, sodaß eine thermische Denaturierung während der Bestrahlung ausgeschlossen war.

Um Sauerstoff aus der Probe zu verdrängen, wurde 2 Std. vor Beginn der Bestrahlung bis zu deren Ende Schutzgas durch eine seitliche Zuleitung über die von einem teflonbeschichteten Magnetprüfstäbchen (ca. 30 Umdrehungen/Min.) umgewälzte Enzymlösung geleitet. Bei Verwendung von vorgereinigtem N₂ ließ man das Gas sich vorher bei 1,5°C

mit Wasser sättigen, damit keine Konzentrierung der Enzymlösung auftreten konnte. Bei Verwendung von N_2O wurde das Gas durch alkalische Pyrogallollösung geleitet, um noch enthaltenen Sauerstoff zu entfernen.

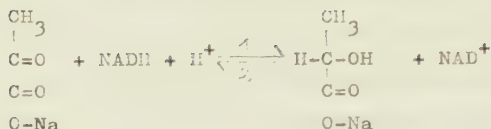
Der Sauerstoffgehalt in der bestrahlten Lösung betrug bei Verwendung von N_2 oder N_2O weniger als $3,0 \cdot 10^{-5}$ Mol/l. In einer Enzymlösung von 1 mg/ml entfielen etwa 4 Moleküle Sauerstoff auf ein LDH-Molekül (29).

Zur Bestimmung der Dosiseffektkurven wurden bei jeder Bestrahlung 12 Proben zu je 50 μ l in gleichmäßigen Abständen entnommen. Zur Entnahme der Proben wurde die Mikropipette gegen den Strom des Schutzgases in den Entnahmestutzen eingeführt, wobei schwerlich Sauerstoff ins Innere eingeschleppt werden konnte. Zwischen den Entnahmen während der Bestrahlung war der Entnahmestutzen durch eine Hostaphanfolie abgedeckt.

2.7. Aktivitätsmessung

2.7.1. Prinzip

Das untersuchte Enzym Lactatdehydrogenase katalysiert folgende Reaktion:



Dabei wird Pyruvat unter Oxydation von NADH zu Laktat reduziert, wobei bei Zimmertemperatur das Gleichgewicht weit auf der Seite von Laktat und NAD^+ liegt. (Reaktion 1)

Die Aktivität von LDH kann nun durch die Messung des Substratumsatzes pro Zeiteinheit unter definierten Bedingungen bestimmt werden. Zur Messung der Enzymaktivität machte sich bereits 1936 O. WARBURG (30) die Tatsache zunutze, daß das an der enzymatischen Redoxreaktion beteiligte Cosubstrat NADH Licht mit einem Maximum bei 340 nm absorbiert, während es in der oxydierten Form als NAD^+ im Bereich von 300-400 nm keine Absorption zeigt. (31,32)

Wegen des stöchiometrischen Reaktionsablaufes wird pro Mol NADH ein Mol Pyruvat umgesetzt. Die beobachtete Anfangsgeschwindigkeit des Extinktionsabfalles ist proportional dem Anfangsumsatz des Substrates Pyruvat und damit der enzymatischen Aktivität.

2.7.2. Durchführung

Zur Messung wurde eine Küvette aus optischem Spezialglas von 1 cm Schichtdicke verwendet. Sie enthielt folgenden Ansatz:

3,00 ml M/15 Na-Phosphatpuffer pH=7,4. Das pH-Optimum von 7,4 wurde von E. WERNER (33) ermittelt.

0,05 ml NADH_2 -Lösung (7,1 mg NADH_2 in 1 ml 1% NaHCO_3)

0,10 ml Enzymverdünnung

0,05 ml Pyruvat-Lösung (8,6 mg Na-Pyruvat in 1 ml Aqua
bidest)

Die Pyruvat- und NADH_2 -Lösungen wurden nicht länger als
3 Tage vor Verwendung angesetzt und bei weniger als 10°C
aufbewahrt.

Der Start der Reaktion erfolgte mit Pyruvat. Sodann wurde
2 sec. lang gut durchgerührt. Die Extinktion wurde nun
im Abstand von 10 sec. mit einem Optilab-Gerät registriert.
Um die Ungenauigkeit beim Ablesen der Extinktion am Photo-
meter gering zu halten, war es notwendig, die Enzymver-
dünnung so zu wählen, daß die Reaktionsgeschwindigkeit
nicht zu hoch wurde. Die Konzentration der LDH im Test-
ansatz betrug im Mittel $0,3 \mu\text{g/ml}$. Auf das Mitführen eines
Leerwertes wurde verzichtet, da die Reaktion ohne den
Katalysator LDH bei Zimmertemperatur praktisch nicht
abließ. (34)

2.7.3. Auswertung

Die alle 10 bzw. 5 sec. gemessenen Werte der Extinktion
wurden graphisch gegen die Zeit aufgetragen und durch
Anlegen einer Tangente an den steilsten, noch linearen
Anfangsteil der Kurve, und auch rechnerisch mit der Me-
thode der kleinsten Quadrate (35) die ideale Steigung
der Kurve und damit der Wert $\Delta E/\text{Min.}$, der ein Maß für

die Aktivität des Enzyms darstellt, ermittelt.

Auf diese Weise wurde mit sämtlichen 12 während der Bestrahlung in gleichem zeitlichen Abstand entnommenen Proben verfahren. So konnte die Abhängigkeit der Abnahme der Enzymaktivität (gemessen in $\Delta E/\text{Min.}$) von der Bestrahlungszeit oder Strahlendosis dargestellt werden.

2.8. Umpuffern und Gefriertrocknen

Da ein hoher Salzgehalt der zu untersuchenden Lösung bei der Aminosäurenanalyse stören kann, (36) war es notwendig, die bei der Bestrahlung am Ende erhaltenen 9,4 ml LDH-Lösung zu entsalzen. Dazu wurde die bestrahlte Enzym-Lösung durch Gelfiltration über Sephadex G 25 fine vom Phosphatpuffer getrennt und in 0,05 M Ammoniumacetatpuffer übergeführt. Die von einem automatischen Fraktions-sammler aufgefangenen Fraktionen wurden mit Ammoniumpolybdat und Aminonaphtol-Lösung auf Anwesenheit von PO_4 -Ionen geprüft und die von PO_4 -Ionen freien weiterverarbeitet. Durch dreimaliges Gefriertrocknen und Wiederaufnehmen in Aqua bidest. wurde das im Vakuum flüchtige Ammoniumacetat entfernt. Das so gefriergetrocknete Enzym konnte dann - auch über Monate - im Kühlschrank bei weniger als 10°C aufbewahrt werden.

2.9. Aminosäureanalyse

2.9.1. Aufbereitung des gefriergetrockneten Enzyms

Durch die Aminosäurenanalyse sollte untersucht werden, ob bei der Bestrahlung in Anwesenheit verschiedener Radikalfänger bestimmte Aminosäuren in besonderem Maße zerstört würden. Es interessierten also quantitative Abnahmen, nicht Veränderungen in der Sequenz. Um diese festzustellen, war es notwendig, möglichst alle Peptidbindungen des Enzyms zu lösen, um so ein untersuchbares Aminosäurengemisch zu erhalten. Als Methode bot sich hier die saure Hydrolyse an, bei der zwar das in LDH enthaltene Tryptophan zerstört wird, was bei basischer Hydrolyse mit Bariumhydroxid verhindert wird. Hierbei jedoch werden wiederum andere Aminosäuren wie Serin, Threonin, Cystein und Cystin zerstört. Aus diesem Grunde ist die saure Hydrolyse die am meisten angewandte Methode (29,34,37,38,5)

Es wurde also jeweils 1 mg des gefriergetrockneten Enzyms mit 2 ml 6n Salzsäure versetzt und in Ampullen eingefroren, die dann auf $4 \cdot 10^{-2}$ Torr evakuiert und abgeschmolzen wurden. Die Hydrolyse wurde bei 110°C 24 Stunden lang durchgeführt. Auf das Variieren der Hydrolysenzeit und anschließendes Interpolieren auf die Hydrolysenzeit Null wurde verzichtet, da selbst diese aufwendige Methode keine besseren Ergebnisse liefert (39). Die 24 Std.-Hydrolyse wurde auch in anderen Arbeiten verwendet (29,34,37,38), sodaß die gefundenen Analysenergebnisse mit diesen verglichen werden konnten.

Nach der Hydrolyse wurden die Lösungen im Rotationsverdampfer eingeengt, um die Salzsäure möglichst zu entfernen. Der Rückstand wurde dreimal in Aqua bidest. aufgenommen und wiederum eingeengt. Danach wurde der Rückstand in 1 ml Natriumcitratpuffer (pH = 2,2; Natriumionenkonzentration 0,2 N) aufgenommen. Von dieser Pufferverdünnung wurden dann je 0,05 - 0,1 ml auf die Säule des Aminosäurenanalysators aufgetragen.

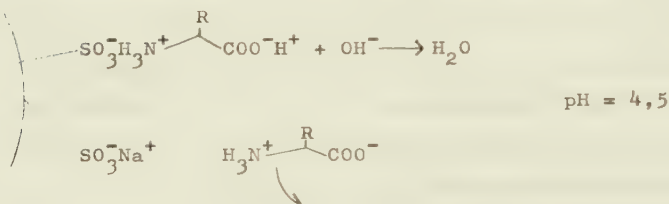
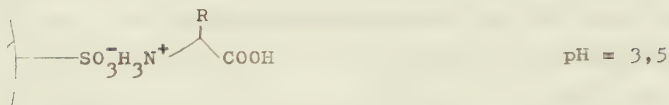
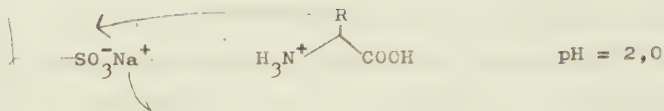
2.9.2. Analysenbedingungen

Die Analysen wurden mit dem automatischen Aminosäurenanalysator BC 200 nach der Methode von SPACKMANN, STEIN und MOORE (40) durchgeführt. Da hierbei die Analysenbedingungen sehr variabel sind und auch Änderungen am Gerät durchgeführt wurden, soll hier kurz auf Prinzip und Analysenbedingungen eingegangen werden.

Bei der quantitativen Bestimmung eines nach der Hydrolyse entstandenen Aminosäurengemisches galt es, zwei Hauptaufgaben zu erfüllen: Die Trennung der einzelnen Aminosäuren und deren quantitative Bestimmung.

Für die Trennung hat sich das Arbeiten nach dem Verdrängungsprinzip durch Anwendung der Ionenaustauschchromatographie bewährt. Auch der verwendete automatische Aminosäurenanalysator BC 200 arbeitete mit Ionenaustauscherharzen. Dabei war eine Glassäule mit Kunstharz gefüllt, das an der Oberfläche geladene Gruppen trug, an

die aus Gründen der Elektronenneutralität stets eine entsprechende Anzahl entgegengesetzt geladener Ionen gebunden war, z.B. Na-Ionen bei den verwendeten Na-Citratpuffern und Harzen vom Sulfonsäuretyp. Auf die Harzoberfläche wurde nun das Aminosäurengemisch bei $\text{pH} = 2,2$ aufgetragen, einem Milieu, bei dem alle Aminosäuren als Kationen vorlagen und daher gegen die Na-Ionen ausgetauscht und an das Harz adsorbiert wurden. Anschließend wurde mit Na-Citratpuffern von ansteigendem pH-Wert eluiert ($\text{pH} = 3,25$; $\text{pH} = 4,25$; $\text{pH} = 6,45$). Da bei Zunahme der pH-Werte die Carboxylgruppe aus der Säure- in die Basenform umgewandelt wurde, nahmen die Aminosäuren nach und nach die Zwitterionenform an, in der sie nur noch durch die auf Grund ihres Dipolcharakters wesentlich schwächeren polaren Kräfte festgehalten werden konnten. Dann wurden die Aminosäuren in ihrer Zwitterform von den Na-Ionen des Puffers verdrängt und flossen aus der Säule ab. Die Reihenfolge ihrer Verdrängung und ihres Austritts aus der Säule wurde daher in erster Linie durch die unterschiedlichen pK-Werte der Carboxylgruppe bestimmt. Daneben trugen zu einem geringen Teil auch das Ausmaß der Polarisierung bzw. apolare Kräfte zu unterschiedlicher Eluierbarkeit und damit zur Trennung der Aminosäuren bei (41).



Adsorption und Elution von Aminosäuren am Ionen-
austauscher. (Aus RAPPOPORT SM.: Medizinische
Biochemie S. 53, Verlag Volk und Gesundheit ,
Berlin (1969))

Zur Bestimmung der am Ende der Säule getrennt austretenden Aminosäuren wurde die Ninhydrinreaktion ausgenutzt. Ninhydrin reagiert mit den Aminosäuren unter Bildung von Ammoniak, Kohlendioxyd und den entsprechenden Aldehyden, wobei ein Dihydrid entsteht, das sich mit Ammoniak zu einem Farbstoff kondensiert. Das Absorptionsmaximum liegt für den blauen Farbstoff der meisten Aminosäuren bei 570 nm,

nur Prolin ergibt einen gelbbraunen Farbstoff, dessen Maximum bei 440 nm liegt. Die relativen Farbausbauten der untersuchten Aminosäuren sind im Vergleich zu Leucin auf molarer Basis nahezu gleich.

Tabelle 1:

Asparaginsäure	0,94
Threonin	0,94
Serin	0,95
Glutaminsäure	0,99
Prolin (bei 440 nm)	0,225
Glycin	0,95
Alanin	0,97
Valin	0,97
Methionin	1,02
Isoleucin	1,00
Leucin	1,00
Tyrosin	1,00
Phenylalanin	1,00
Histidin	1,02
Lysin	1,10
Arginin	1,01

Relative Farbausbauten von Aminosäuren auf molarer Basis im Vergleich zu Leucin = 1,00 (Aus MOORE S. und STEIN W.H.: J. Biol. Chem. 211, 907 (1954))

Nach Austritt der Aminosäuren aus der Säule wurden sie kontinuierlich mit Ninhydrin versetzt und anschließend in einem Photometer mit hintereinandergeschalteten Durchflußküvetten bei 570 und 440 nm gemessen. Wegen der Unbeständigkeit der gebildeten Farbstoffe gegenüber Sauerstoff mußte das ganze System geschlossen sein.

Bei der Wahl der Säulentemperatur war zu beachten, daß die Aminosäuren möglichst gut getrennt wurden. Vorallem Glutaminsäure und Prolin geben oft schlechte Trennungen. Bei der verwendeten Temperatur von 52°C war sie jedoch gut. Bei der unvollständigen Trennung von Threonin und Serin empfahl sich ein Zusatz von 4% Äthylalkohol zum 1. Puffer (pH = 3,25) , was zwar nicht zu vollkommener Trennung, jedoch zu auswertbaren Ergebnissen führte.

Als sehr störend erwies sich der in der umgebenden Laborluft enthaltene Ammoniak, der beim Ansetzen der Puffer sich in diesen löste und bei der Analyse mit den basischen Aminosäuren erschien und diese überlagerte. Abhilfe konnte mit einer Vorwaschsäule (60 cm · 0,9 cm) geschaffen werden, die mit dem Kationenaustauscherharz AG 50W-X8, 50-100 mesh der Fa. BIORAD, München gefüllt war. Dadurch wurde der Ammoniak aus den Puffern abgefangen.

2.9.3. Auswertung und Berechnung

Die am Photometer gemessenen Extinktionen wurden mit einem in den Aminosäurenanalysator eingebauten Punktschreiber

registriert. Die Aminosäuren zeigten sich in nahezu symmetrischen Peaks. Die Flächenberechnung wurde mit Hilfe der Höhe und Halbwertsbreite der Peaks durchgeführt. So war es möglich, auch Peaks auszuwerten, die nicht vollständig getrennt waren. Voraussetzung war dabei natürlich die Trennung zweier Aminosäuren-Peaks mindestens unter die halbe Höhe des kleineren Peaks. Der aus dem Produkt $H \cdot W$ (H = Nettohöhe; B = Breite des Peaks in halber Höhe, gemessen in Anzahl der Punkte des Schreibers) gefundene Wert für die einzelne Aminosäure wurde dividiert durch einen bei gleichen Analysenbedingungen gemessenen Standardwert. Im Idealfall wäre bei mehreren Analysen der gleichen zu untersuchenden Probe das Verhältnis der einzelnen Aminosäuren eines Testlaufes zueinander gleich gewesen, nur unterschieden durch einen Faktor, der durch unterschiedliche Volumina beim Auftragen der Probe auf die Säule entstanden ist. Diese Unterschiede konnten durch Verwendung einer Bezugsaminosäure entfernt werden. Wegen seiner relativ geringen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten mit e^-_{aq} und $OH^\bullet$ (29) wurde dafür Leucin verwendet, wie dies auch in früheren Arbeiten geschehen ist (29,34,42). Unter Zugrundelegung eines Molekulargewichtes der LDH von 142000 wurde für Leucin ein Wert von 140,0 gesetzt und die Werte der anderen Aminosäuren darauf bezogen.

3. Ergebnisse

3.1. Dosiseffektkurven

Die Röntgenstrahlenempfindlichkeit von LDH in wässriger Lösung wurde unter weitgehend anaeroben Bedingungen untersucht. Um den gelösten Sauerstoff zu verdrängen, wurde bei den Versuchen mit Äthanol und t-Butanol als Radikalfänger das inerte Gas Stickstoff in vorgereinigter Form über die Enzymlösung geleitet, bei den Versuchen mit Lachgas als Radikalfänger wurde dieses durch alkalische Pyrogallollösung geleitet (Vergl. 2.6.3.)

Abb. 1 zeigt die Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität einer LDH-Lösung unter Zusatz verschiedener Radikalfänger von der applizierten Strahlendosis. Die Aktivität nimmt exponentiell mit der Dosis ab.

In Tabelle 2 soll ein Überblick über die verschiedenen Inaktivierungsdosen D_{37} , die dazugehörenden G-Werte (G-Wert = Zahl der veränderten Moleküle pro 100 Elektronenvolt) sowie die Bestrahlungsdosen und die Restaktivitäten der Proben gegeben werden, die für die Aminosäureanalysen verwendet wurden.

Tabelle 2:

Radikalfänger	D_{37} in krd	G-Wert	Gesamtdosis in krd	Restaktivität
ohne Rad.Fäng.	82	$5,3 \cdot 10^{-2}$	400	kleiner als 1%
$10^{-2}M$ t-Butanol	92	$4,7 \cdot 10^{-2}$	400	2%
$10^{-2}M$ Athanol	127	$3,4 \cdot 10^{-2}$	310	8%
N_2O	45	$9,6 \cdot 10^{-2}$	125	7%

Die Werte ohne Radikalfänger wurden zum Vergleich von KUNIGK (29) übernommen.

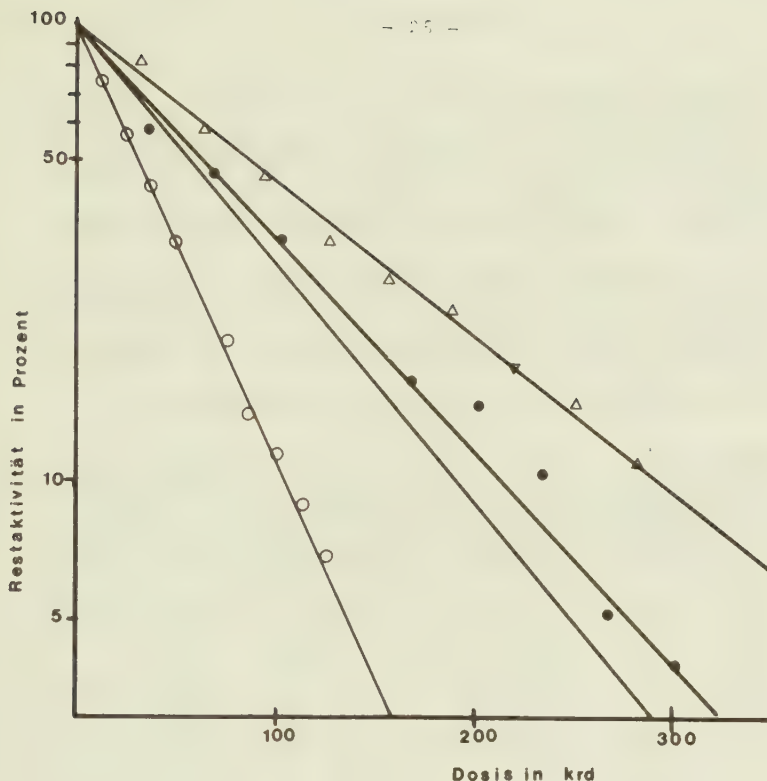


Abb. 1

Abhängigkeit der Enzymaktivität (in % des Ausgangswertes) einer LDH-Lösung unter Zusatz verschiedener Radikalfänger von der applizierten Strahlendosis (in krd)

- LDH mit t-Butanol
- LDH mit N₂O
- △— LDH mit Äthanol
- LDH ohne Radikalfänger (Werte von KUNIGK (29) übernommen)

3.2. Aminosäurenanalysen

Eine Aminosäurenanalyse ermöglicht es festzustellen, ob durch die Einwirkung ionisierender Strahlung die Primärstruktur eines Proteins verändert wird. Um Vergleiche mit den Ergebnissen anderer Autoren ziehen zu können, wurde zuerst native LDH untersucht und in Tabelle 3 früheren Untersuchungsergebnissen gegenübergestellt. Bei einem Vergleich zeigt sich eine relativ gute Übereinstimmung.

Tabelle 3:

AS	WIELAND PFLEIDERER	PESCE et al.	DENKL	KUNIGK	OFFINGER
Asp	116	120,8 $\pm$ 1,2	120	119,1 $\pm$ 5,8	117,6 $\pm$ 0,8
Thr	51	45,8 $\pm$ 5,4	45,3	47,7 $\pm$ 2,7	45,7 $\pm$ 0,3
Ser	92	84,5 $\pm$ 3,3	87,3	80,4 $\pm$ 3,3	85,3 $\pm$ 1,2
Glu	114	121,0 $\pm$ 1,5	125	129,1 $\pm$ 1,0	121,8 $\pm$ 1,0
Pro	41	40,6 $\pm$ 2,5	44	50,4 $\pm$ 2,8	45,0 $\pm$ 3,3
Gly	101	108,7 $\pm$ 3,5	99	97,9 $\pm$ 2,3	100,1 $\pm$ 1,6
Ala	82	86,0 $\pm$ 1,4	81	84,1 $\pm$ 1,3	82,0 $\pm$ 0,4
Val	136	136,5 $\pm$ 2,0	120	126,9 $\pm$ 1,7	125,1 $\pm$ 1,0
Met	34	34,4 $\pm$ 0,9	32	34,8 $\pm$ 2,7	32,8 $\pm$ 1,9
I-Leu	85	82,3 $\pm$ 1,3	72	76,6 $\pm$ 1,9	75,7 $\pm$ 0,9
Leu	140	141,5 $\pm$ 3,7	140	140	140
Tyr	28	26,0 $\pm$ 0,4	25	26,7 $\pm$ 0,2	27,1 $\pm$ 0,5
Phe	28	26,0 $\pm$ 1,0	25,8	26,8 $\pm$ 0,3	26,6 $\pm$ 0,3
His	40	40,6 $\pm$ 1,0	39,3	40,7 $\pm$ 0,7	39,4 $\pm$ 0,9
Lys	105	104,0 $\pm$ 2,8	103	100,0 $\pm$ 5,0	103,0 $\pm$ 1,0
Arg	38	37,0 $\pm$ 4,8	40	38,8 $\pm$ 1,4	40,3 $\pm$ 0,8

Vergleich der Ergebnisse der Aminosäurenanalyse von
nativer LDH mit denen früherer Autoren. (37,38,34,29)

Die Werte von WIELAND und PFLEIDERER wurden auf ein Molekulargewicht von 140000 umgerechnet. Die eigenen Ergebnisse wurden angegeben als Mittelwert $M \pm$ Standardfehler σ aus 8 Analysen (2 Hydrolysate zu je 4 Analysen).

In der folgenden Tabelle 4 sind die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen mit nativer LDH sowie unter Zusatz verschiedener Radikalfänger bestrahlter LDH aufgeführt.

Tabelle 4:

AS	Native LDH 8 Werte aus 2 Hydrolys.	Unter N ₂ und t-Butanol be- strahlte LDH 14 Werte aus 3 Hydrolys.	Unter N ₂ und Äthanol be- strahlte LDH 10 Werte aus 2 Hydrolys.	Unter N ₂ O be- strahlte LDH 11 Werte aus 2 Hydrolys.
Asp	117,6 $\pm$ 0,8	116,7 $\pm$ 1,8	115,9 $\pm$ 1,6	117,6 $\pm$ 1,2
Thr	45,7 $\pm$ 0,3	45,2 $\pm$ 2,3	44,7 $\pm$ 1,0	43,3 $\pm$ 1,7
Ser	85,3 $\pm$ 1,2	81,3 $\pm$ 2,6	80,8 $\pm$ 2,0	85,9 $\pm$ 1,9
Glu	121,8 $\pm$ 1,0	119,8 $\pm$ 4,8	116,0 $\pm$ 1,6	117,6 $\pm$ 2,9
Pro	45,0 $\pm$ 3,3	40,4 $\pm$ 2,0	37,0 $\pm$ 2,8	40,1 $\pm$ 1,9
Gly	100,1 $\pm$ 1,6	96,4 $\pm$ 3,9	92,3 $\pm$ 1,7	96,7 $\pm$ 2,6
Ala	82,0 $\pm$ 0,4	86,3 $\pm$ 1,6	80,1 $\pm$ 1,7	79,1 $\pm$ 2,0
Val	125,1 $\pm$ 1,0	119,1 $\pm$ 5,3	122,3 $\pm$ 1,6	120,6 $\pm$ 3,0
Met	32,8 $\pm$ 1,9	27,9 $\pm$ 0,9	12,5 $\pm$ 1,4	31,7 $\pm$ 1,9
I-Leu	75,7 $\pm$ 0,9	79,8 $\pm$ 1,9	72,2 $\pm$ 1,9	73,8 $\pm$ 2,1
Leu	140	140	140	140
Tyr	27,1 $\pm$ 0,5	19,4 $\pm$ 1,5	20,3 $\pm$ 0,5	24,3 $\pm$ 0,6
Phe	26,6 $\pm$ 0,3	22,2 $\pm$ 2,4	23,6 $\pm$ 1,0	23,9 $\pm$ 0,7
His	39,4 $\pm$ 0,9	33,7 $\pm$ 1,5	31,5 $\pm$ 1,1	34,8 $\pm$ 2,1
Lys	103,0 $\pm$ 1,0	99,7 $\pm$ 1,5	100,4 $\pm$ 1,6	100,4 $\pm$ 1,1
Arg	40,3 $\pm$ 0,8	39,0 $\pm$ 1,9	36,2 $\pm$ 0,9	39,0 $\pm$ 1,6

Anzahl der Aminosäuren pro Molekül nativer LDH und unter Zusatz verschiedener Radikalfänger bestrahlter LDH.

Bei Bestrahlung unter t-Butanol:

Dosis = 400 krd; Restaktivität = 2%

Bei Bestrahlung unter Äthanol:

Dosis = 310 krd; Restaktivität = 8%

Bei Bestrahlung unter N_2O :

Dosis = 125 krd; Restaktivität = 7%

Zur besseren Vergleichsmöglichkeit werden die Ergebnisse aus Tabelle 4 in der folgenden Tabelle 5 prozentual zur nativen LDH angegeben. Die Werte von unter N_2 ohne Zusatz von Radikalfängern bestrahlter LDH wurden von KUNIGK (29) übernommen.

Tabelle 5:

AS	Unter N ₂ und t-Butanol be- strahlte LDH	Unter N ₂ und Athanol be- strahlte LDH	Unter N ₂ O be- strahlte LDH	Unter N ₂ be- strahlte LDH
Asp	99	99	100	98
Thr	99	98	<u>95</u>	92
Ser	<u>95</u>	<u>95</u>	100	104
Glu	98	<u>95</u>	97	<u>95</u>
Pro	90	<u>82</u>	89	<u>73</u>
Gly	96	<u>92</u>	97	96
Ala	105	98	96	97
Val	95	98	96	95
Met	<u>85</u>	<u>38</u>	97	<u>77</u>
I-Leu	105	<u>95</u>	97	<u>93</u>
Leu	100	100	100	100
Tyr	<u>72</u>	<u>75</u>	<u>90</u>	<u>90</u>
Phe	<u>83</u>	<u>89</u>	<u>90</u>	<u>91</u>
His	<u>86</u>	<u>80</u>	<u>88</u>	<u>84</u>
Lys	97	97	97	96
Arg	97	<u>90</u>	97	<u>93</u>

Anzahl der Aminosäuren pro Molekül unter Zusatz verschiedener Radikalfänger bestrahlter LDH in Prozent der nativen LDH. Werte mit signifikanter Abnahme (außerhalb der gegenseitigen 3 σ -Grenze) sind unterstrichen. Die Werte unter N₂ bestrahlter LDH sind der Arbeit von KUNIGK (29) übernommen. Verwendete Dosis und verbliebene Restaktivität siehe Tabelle 4.

Bei der Wahl der Bestrahlungszeit (= Maß für die Dosis) wurde eine ungefähr gleiche Restaktivität der später zu untersuchenden Proben angestrebt (kleiner als 10%). Bei fast allen Bestrahlungsbedingungen findet man einen Abbau der Aminosäurereste: Met, Tyr, Phe und His, während man nach Bestrahlungen in Gegenwart von Äthanol auch Verluste bei Ser, Glu, Pro, Gly und Arg feststellt. Um aber die Zerstörung einzelner Aminosäuren unabhängig von der Dosis vergleichen zu können, wie sie unter verschiedenen Bedingungen - auch bei verschiedenen Enzymen - gefunden wurde, ist es notwendig, auf gleiche Dosis und gleiche molare Enzymkonzentration umzurechnen. Dies geschah mit Hilfe der Berechnung der G-Werte. (Der G-Wert gibt die Zahl der veränderten Aminosäurereste pro 100 Elektronenvolt an)

Tabelle 6:

AS	Unter N ₂ und t-Butanol bestrahlte LDH	Unter N ₂ und Athanol bestrahlte LDH	Unter N ₂ O bestrahlte LDH	Unter N ₂ bestrahlte LDH (KUNIGK)
Met	0,08	0,45	+)	0,41
Tyr	0,13	0,15	0,15	0,14
Phe	0,08	0,07	0,15	0,12
His	0,10	0,18	0,25	0,34

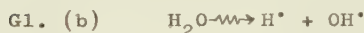
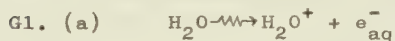
G-Werte der am stärksten zerstörten Aminosäuren bei der Bestrahlung von LDH. (Prozentuale Abnahme größer als 10%)

+) = Keine signifikante Abnahme (3σ - Grenze)

4. Diskussion

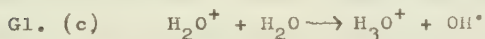
LDH wurde mit der Konzentration $1 \text{ mg/ml} \hat{=} 7,14 \cdot 10^{-6} \text{ Mol/l}$ in 10^{-1} M Natriumphosphatpuffer $\text{pH} = 7,0$ bestrahlt. Bei solchen Konzentrationen sind Veränderungen am Enzym, sei es in seiner Zusammensetzung oder in seiner biologischen Wirkung, durch indirekte Strahlenwirkung bedingt. Die Wahrscheinlichkeit, daß bei Bestrahlung ein Wassermolekül getroffen wird, ist sehr viel höher als die Wahrscheinlichkeit direkt ein Enzymmolekül zu treffen. Die Absorption der Strahlenenergie durch die Wassermoleküle führt zur Bildung von Radikalen, die mit den gelösten Enzymmolekülen reagieren. Diese Radikalreaktionen führen zu einer viel höheren Strahlenwirkung am Enzym, als dies bei Bestrahlung im Trockenen der Fall wäre.

Nach Gleichung (a) und (b) sind die bei der Wasserradiolyse entstehenden Radikale $\text{H}^{\bullet}$, $\text{OH}^{\bullet}$ und e_{aq}^{-} .



Das entstehende Elektron umgibt sich in so kurzer Zeit mit einer Hydrathülle, daß man bisher noch keine Reaktionen von nicht solvatisierten Elektronen im Wasser nachweisen konnte (43).

Das entstandene H_2O^+ - Ion reagiert sofort nach seiner Bildung nach Gl. (c) wie folgt:



Nach massenspektrometrischen Untersuchungen läuft diese Reaktion bereits nach $\text{ca. } 10^{-13} \text{ sec}$ ab (43).

Mit dem gebildeten Hydroniumion H_3O^+ kann wiederum ein solv. Elektron nach Gl. (d) reagieren, jedoch läuft diese Reaktion nur im stark sauren Bereich mit hoher Geschwindigkeit ab, im bei der vorliegenden Arbeit verwendeten neutralen Bereich ($pH = 7,0$) spielt diese Reaktion keine Rolle (43).



Um Reaktionen zwischen O_2 und den Radikalen zu vermeiden, wurden die Bestrahlungen unter dem inerten Gas N_2 oder unter N_2O -Atmosphäre, auf deren spezielle Wirkung später noch eingegangen wird, durchgeführt.

Zum quantitativen Verständnis der Strahlenchemie wässriger Systeme ist es wichtig, die 100 eV - Ausbeuten der radikalischen Zersetzungsprodukte des Wassers zu kennen. Nach DRAGANIC J.G. (44) sind die Werte für die 100 eV - Ausbeuten der Wasserradikale bei Röntgenstrahlen und $pH = 7,0$ folgende:

$$G(OH^\bullet) = 2,70$$

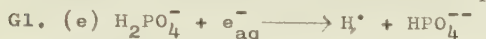
$$G(H^\bullet) = 0,58$$

$$G(e_{aq}^-) = 2,65$$

Um den pH bei den Bestrahlungsversuchen konstant zu halten, ist es notwendig in einem Puffer zu arbeiten. Dies geschah mit 10^{-1} M Natriumphosphatpuffer $pH = 7,0$. Bei der im Verhältnis zur Enzymkonzentration sehr viel höheren Konzentration der Phosphat-Ionen ($7,14 \cdot 10^{-6}$ zu 10^{-1}) ist zu bedenken, ob durch das Phosphat-Ion nicht die Reaktion der Wasserradikale mit LDH beeinflusst wird.

SORTNER S., OTTOLENGHI M., RABANI S. und STEIN G. (45)

fanden die Reaktion des H_2PO_4^- - Ions mit solvatisierten Elektronen, wobei auf Kosten des e_{aq}^- ein $\text{H}^\bullet$ entsteht.



Das H_2PO_4^- - Ion konkurriert also mit LDH um das solv.

Elektron. Welche Radikale nun überwiegend mit LDH reagieren, hängt von der Konzentration der konkurrierenden Stoffe und der Geschwindigkeit der Reaktion zwischen den einzelnen Stoffen und LDH ab.

Die Wahrscheinlichkeit, daß ein Stoff A mit einem Stoff S unter Anwesenheit anderer Stoffe B, C, D, ... reagiert, läßt sich nach (43) durch folgende Gleichung ausdrücken:

$$\text{Gl. (f)} \quad W_{\text{A+S}} = \frac{[\text{A}] \cdot k_{\text{A+S}}}{[\text{A}] \cdot k_{\text{A+S}} + [\text{B}] \cdot k_{\text{B+S}} + [\text{C}] \cdot k_{\text{C+S}} + \dots}$$

wobei $W_{\text{A+S}}$ die Wahrscheinlichkeit, daß Stoff A mit Stoff S reagiert,

$[\text{A}]$, $[\text{B}]$, $[\text{C}]$... die molare Konzentration der Stoffe A, B, C, ...

$k_{\text{A+S}}$, $k_{\text{A+B}}$... die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante für die Reaktion $\text{A+S} \rightarrow \text{AS}$, $\text{B+S} \rightarrow \text{BS}$, ... ausdrückt.

Durch Wahl und Zugabe geeigneter Stoffe bei der Bestrahlung ($k_{\text{Zusatzstoff}} + \text{R}^\bullet$ und Zusatzstoff möglichst groß) ist es also möglich, mehr oder weniger vollständig einzelne Wasser-radikale abzufangen und so die möglicherweise unterschiedlichen Wirkungen der einzelnen Radikale am Enzym zu untersuchen.

Für die Berechnung der Reaktionswahrscheinlichkeit von LDH bei Anwesenheit von ausgesuchten Radikalfängerstoffen ist es notwendig, die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten von LDH mit den Radikalen $\text{OH}^\bullet$, $\text{H}^\bullet$ und e_{aq}^- zu wissen.

Diese sind jedoch noch nicht bekannt. Durch Vergleich mit den Werten anderer Enzyme soll eine möglichst treffende Schätzung vorgenommen werden. Bereits gut untersucht sind die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten von RNase. Folgende Werte wurden gefunden (46,47):

$$\text{RNase} + \text{OH}^\bullet : 2,4 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$$

$$\text{RNase} + \text{H}^\bullet : 1,5 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$$

$$\text{RNase} + \text{e}_{\text{aq}}^- : 1,0 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$$

Die folgenden Werte für die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten wurden den Aufstellungen von (48), (49), (50) entnommen.

Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten von $\text{OH}^\bullet$ mit anderen Enzymen sind teilweise bereits bekannt, so die von

$$\text{Alkoholdehydrogenase} + \text{OH}^\bullet : 2,2 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$$

$$\text{Trypsinogen} + \text{OH}^\bullet : 1,6 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$$

$$\text{Lysozym} + \text{OH}^\bullet : 5 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$$

$$\text{RNase} + \text{OH}^\bullet : 2,4 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$$

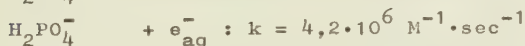
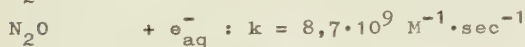
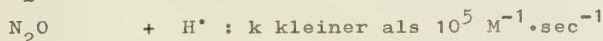
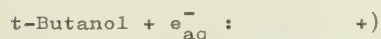
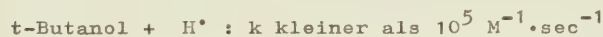
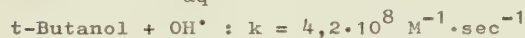
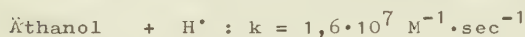
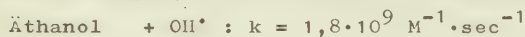
$$\text{Trypsin} + \text{OH}^\bullet : 1 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$$

Aus diesen Werten ist folgendes zu sehen:

1. Die Werte für die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der einzelnen Radikale mit dem gleichen Enzym liegen nicht weit auseinander (siehe RNase!)
2. Die Werte für die verschiedenen Enzyme bewegen sich im Bereich von $10^{10} - 10^{11} \text{ M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$.

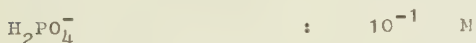
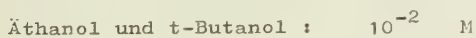
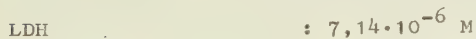
Für die noch nicht bekannten Werte von LDH mit den Radikalen der Wasserirradiolyse wurde deshalb einheitlich der Wert $5 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ angenommen.

Bekannt sind jedoch die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten einiger als Radikalfänger verwendbarer Stoffe mit $\text{OH}^\bullet$, $\text{H}^\bullet$ und e_{aq}^- . Nachfolgend aufgezeichnet sind die Werte für Äthanol, t-Butanol und N_2O , die in der vorliegenden Arbeit als Radikalfänger verwendet wurden, sowie für H_2PO_4^- , das im Puffer vorlag (Angaben aus (48,49,50)).



+) = Reaktion nicht oder nur in unbedeutendem Maße beobachtbar.

Die verwendeten Konzentrationen waren:



Mit Hilfe dieser Angaben ist es möglich, die Reaktionswahrscheinlichkeit von LDH mit den Radikalen der Wasserradiolyse unter dem Zusatz verschiedener Radikalfänger zu berechnen.

Wie oben erwähnt, fängt H_2PO_4^- solv. Elektronen unter Bildung von $\text{H}^\bullet$ - Radikalen mit einer Reaktionsgeschwindigkeitskonstante von $4,2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ ab.

$$W_{\text{LDH}+\text{e}_{\text{aq}}^-} = \frac{[\text{LDH}] \cdot k_{\text{LDH}+\text{e}_{\text{aq}}^-}}{[\text{LDH}] \cdot k_{\text{LDH}+\text{e}_{\text{aq}}^-} + [\text{H}_2\text{PO}_4^-] \cdot k_{\text{H}_2\text{PO}_4^- + \text{e}_{\text{aq}}^-}} = 0,46$$

d.h. 46% der Elektronen reagieren noch mit LDH, 54% werden von H_2PO_4^- abgefangen. Die 100 eV-Ausbeute an Radikalen, die unter den veränderten Bedingungen zur Reaktion mit LDH zur Verfügung stehen, verändert sich demnach für e_{aq}^- von 2,65 auf 1,22 (46%) und für $\text{H}^\bullet$ von 0,58 auf 2,01 ($0,58 + (2,65 - 1,22)$) bei Bestrahlung unter N_2 - Atmosphäre ohne Zusatz von Radikalfängern.

Bei N_2 : $g(\text{OH}^\bullet)=2,70$; $g(\text{H}^\bullet)=2,01$; $g(\text{e}_{\text{aq}}^-)=1,22$

Bei Bestrahlung unter N_2O werden nach folgender Gleichung (g) e_{aq}^- abgefangen:



$$W_{\text{LDH}+\text{e}_{\text{aq}}^-} = \frac{[\text{LDH}] \cdot k_{\text{LDH}+\text{e}_{\text{aq}}^-}}{[\text{LDH}] \cdot k_{\text{LDH}+\text{e}_{\text{aq}}^-} + [\text{H}_2\text{PO}_4^-] \cdot k_{\text{H}_2\text{PO}_4^- + \text{e}_{\text{aq}}^-} + [\text{N}_2\text{O}] \cdot k_{\text{N}_2\text{O}+\text{e}_{\text{aq}}^-}} =$$

= kleiner als 0,1%

$$W_{H_2PO_4^- + e_{aq}^-} = \text{kleiner als } 0,1\% : W_{N_2O + e_{aq}^-} = 0,998 = 99,8\%$$

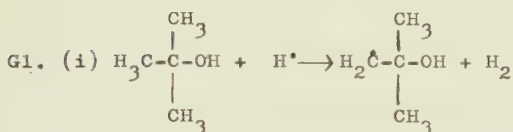
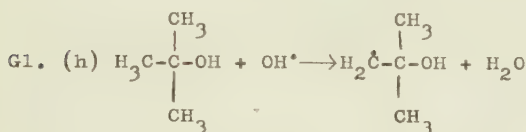
Durch N_2O werden also praktisch alle e_{aq}^- abgefangen,

der Anteil an $OH^\bullet$ erhöht sich entsprechend.

$$\text{Bei } N_2O : g(OH^\bullet) = 5,35; g(H^\bullet) = 0,58; g(e_{aq}^-) = 0$$

Bei Zusatz von t-Butanol kann dieses nach Gleichung (h)

und Gleichung (i) mit $OH^\bullet$ und $H^\bullet$ reagieren:



$$W_{LDH+OH^\bullet} = \frac{[LDH] \cdot k_{LDH+OH^\bullet}}{[LDH] \cdot k_{LDH+OH^\bullet} + [But] \cdot k_{But+OH^\bullet}} = 0,08$$

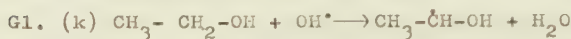
d.h. nur noch 8% der $OH^\bullet$ reagieren mit LDH, 92% werden von t-Butanol abgefangen.

$$W_{LDH+H^\bullet} = \frac{[LDH] \cdot k_{LDH+H^\bullet}}{[LDH] \cdot k_{LDH+H^\bullet} + [But] \cdot k_{But+H^\bullet}} = 0,997$$

d.h. durch t-Butanol werden keine (weniger als 0,3%) $H^\bullet$ abgefangen.

$$\text{Bei t-Butanol: } g(OH^\bullet) = 0,22; g(H^\bullet) = 2,01; g(e_{aq}^-) = 1,22; g(t\text{-But}^\bullet) = 2,48$$

Bei Zusatz von Äthanol kann dieses nach Gleichung (k) und Gleichung (1) mit $\text{OH}^\bullet$ und $\text{H}^\bullet$ reagieren:



$$W_{\text{LDH}+\text{OH}^\bullet} = \frac{[\text{LDH}] \cdot k_{\text{LDH}+\text{OH}^\bullet}}{[\text{LDH}] \cdot k_{\text{LDH}+\text{OH}^\bullet} + [\text{Äth}] \cdot k_{\text{Äth}+\text{OH}^\bullet}} = 0,02$$

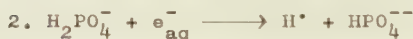
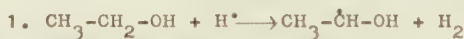
d.h. nur noch 2% der $\text{OH}^\bullet$ reagieren mit LDH, 98% werden von Äthanol abgefangen.

$$W_{\text{LDH}+\text{H}^\bullet} = \frac{[\text{LDH}] \cdot k_{\text{LDH}+\text{H}^\bullet}}{[\text{LDH}] \cdot k_{\text{LDH}+\text{H}^\bullet} + [\text{Äth}] \cdot k_{\text{Äth}+\text{H}^\bullet}} = 0,69$$

d.h. 69% der $\text{H}^\bullet$ reagieren noch mit LDH, 31% werden von Äthanol abgefangen.

Für die Berechnung der $g(\text{H}^\bullet)$ und $g(\text{e}_{\text{aq}}^-)$ -Werte sind

2 Reaktionen zu berücksichtigen:



Berechnet man das Produkt aus Konzentration und Reaktionsgeschwindigkeitskonstante, so ergeben sich für

1. $10^{-2} \cdot 1,6 \cdot 10^7 = 1,6 \cdot 10^5 \text{ sec}^{-1}$ und für

2. $10^{-1} \cdot 4,2 \cdot 10^6 = 4,2 \cdot 10^5 \text{ sec}^{-1}$

Beide Reaktionen laufen also ungefähr gleich schnell nebeneinander ab. Als Grenzfälle werden beide Reaktionen zeitlich hintereinander betrachtet.

Es ergeben sich für $g(H^{\bullet})$ als Grenzwerte 1,39 und 1,83
 und für $g(\text{Äthanol}^{\bullet})$ als Grenzwerte 3,27 und 2,83
 Bei Äthanol: $g(OH^{\bullet})=0,05$; $g(H^{\bullet})=1,39-1,83$; $g(e_{aq}^{-})=1,22$:
 $g(\text{Äthanol}^{\bullet})=2,83-3,27$

Diesen für die verschiedenen Bestrahlungsbedingungen berechneten g -Werten sollen nun im folgenden die G -Werte für die Inaktivierung des Enzyms und für die Zerstörung einzelner Aminosäuren gegenübergestellt werden. In Tabelle 7 werden die Werte der Einzelradikalausbeuten mit den Werten für die Inaktivierung des Enzyms verglichen. Interessant ist, daß bei Ansteigen der $OH^{\bullet}$ -Werte auch der $G_{\text{Inakt.}}$ höher wird. Bei N_2O ist der $OH^{\bullet}$ -Wert ungefähr doppelt so hoch wie bei N_2 . Der $G_{\text{Inakt.}}$ -Wert nimmt ebenfalls ungefähr um den Faktor 2 zu. Man könnte daraus schließen, daß vor allem die $OH^{\bullet}$ -Radikale die Inaktivierung bedingen, wie es bereits von anderen Autoren bei anderen Enzymen gezeigt wurde. (3,52)

Dagegen sprechen jedoch die Werte bei Äthanol- und t -Butanol-Zusatz, wo einem viel kleineren $OH^{\bullet}$ -Wert nur relativ kleine Erniedrigungen der $G_{\text{Inakt.}}$ -Werte gegenüberstehen. Zu beachten ist jedoch, daß hier in nicht unbeträchtlichem Maße Äthanol- und t -Butanol-Radikale vorhanden sind. Reagieren diese Alkoholradikale mit dem Enzym, so könnte die nicht ins Bild vom Zusammenhang der $OH^{\bullet}$ - und $G_{\text{Inakt.}}$ -Werte passende geringe Erniedrigung der $G_{\text{Inakt.}}$ -Werte bei Abfangen der $OH^{\bullet}$ durch die Alkohole verstanden werden.

Tabelle 7:

Bestrahlungsbedingungen	G-Werte der Inaktivierung	g-Werte für				
		OH [•]	H [•]	e ⁻ _{aq}	Ath [•]	But [•]
N ₂ +Äth	0,034	0,05	1,39- 1,83	1,22	2,83- 3,27	-
N ₂ +t-But	0,047	0,22	2,01	1,22	-	2,48
N ₂ (KUNIGK)	0,053	2,70	2,01	1,22	-	-
N ₂ O	0,096	5,35	0,58	-	-	-

Tabelle 8:

Bestrahlungsbedingungen	G-Werte f. d. Abbau v.				g-Werte für				
	Met	Tyr	Phe	His	OH [•]	H [•]	e ⁻ _{aq}	Ath [•]	But [•]
N ₂ +Äth	0,45	0,15	0,07	0,18	0,05	1,39- 1,83	1,22	2,83- 3,27	-
N ₂ +t-But	0,08	0,13	0,08	0,10	0,22	2,01	1,22	-	2,48
N ₂ (KUNIGK)	0,41	0,14	0,12	0,34	2,70	2,01	1,22	-	-
N ₂ O	+))	0,15	0,15	0,25	5,35	0,58	-	-	-

+) Wert der bestrahlten LDH liegt nicht außerhalb der gegenseitigen 3 σ -Grenze mit nativer LDH

SCHÜSSLER H. (5) konnte bei Bestrahlung von RNase unter Äthanol eine Wirkung der Äthanol-Radikale auf die Aktivität der RNase nachweisen. Von SCHÜSSLER H. und MEE L.K. (53) wurde RNase mit C^{14} -markiertem Äthanol bestrahlt und anschließend gelfiltriert. Dabei konnte in der RNase-Fraktion C^{14} nachgewiesen werden. Bei Kontrollversuchen, bei denen RNase erst nach der Bestrahlung mit C^{14} -markiertem Äthanol inkubiert wurde, war der Nachweis von C^{14} in der RNase-Fraktion nicht möglich. C^{14} -markiertes Äthanol konnte also nur während der Bestrahlung mit dem Enzym reagieren. Damit ist der Nachweis einer Reaktion des Alkoholradikals mit dem Enzym für Äthanol erbracht. So kann für LDH gesagt werden, daß ein Abfangen der $OH^\bullet$ -Radikale bei Bestrahlung als Schutzeffekt für die Aktivität wirkt, der jedoch durch die dabei entstehenden Alkoholradikale möglicherweise verringert werden kann.

Bei den Ergebnissen der Aminosäurenanalyse soll untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen den G-Werten für den Abbau den Aminosäurenreste im Protein und den vorhandenen mit LDH reagierenden Radikalen besteht. In Tabelle 8 sind die G-Werte für den Abbau der Aminosäuren, die nach Tabelle 5 die größten prozentualen Abnahmen aufweisen, und die g-Werte der reagierenden Radikale zusammengestellt.

Es ist zunächst auffallend, daß bei der Radiolyse von LDH die gleichen Aminosäurenreste abgebaut werden wie bei RNase (54,55,56,57,58), nämlich: Met, Tyr, Phe und His.

Da diese Aminosäuren größere Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktion mit $\text{OH}^\bullet$ -Radikalen besitzen als die übrigen Aminosäuren (59), ist es zuerst naheliegend anzunehmen, daß $\text{OH}^\bullet$ -Radikale den Abbau dieser Aminosäurenreste bewirken.

Tabelle 8 läßt aber keinen Zusammenhang zwischen dem Abbau dieser Aminosäuren und dem Wert für $\text{OH}^\bullet$ erkennen. Nach ANBAR M. und NETA P. (48) ist die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante für $\text{Met} + \text{OH}^\bullet$ ($4,9 \cdot 10^9$) über 100 mal größer als die für $\text{Met} + e_{\text{aq}}^-$ ($3,5 \cdot 10^7$). Aber gerade bei Bestrahlung unter N_2O , wo sehr viele $\text{OH}^\bullet$ -Radikale vorhanden sind, kann keine signifikante Abnahme von Met bei LDH gefunden werden, wogegen bei kleinem $\text{OH}^\bullet$ -Wert die Zerstörung beträchtlich ist. Zu bedenken ist jedoch, daß bei der Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für Aminosäuren diese in freier Form vorlagen, je nach pk-Wert eine NH_3^+ - und COO^- -Gruppe trugen, statt deren beim Enzym Peptitbindungen vorhanden sind.

SHAPIRA R. und STEIN G. (60) konnten zeigen, daß Met, Tyr und Phe sehr spezifisch mit $\text{H}^\bullet$ reagieren. Dieser Zusammenhang mit dem $\text{H}^\bullet$ -Wert kann bei LDH nach Tabelle 8 weder für Met noch für Tyr, Phe oder His gefunden werden. Tyr z.B. hat bei allen Bedingungen ungefähr den gleichen G-Wert, obwohl der Wert für $\text{H}^\bullet$ bis zum 3,5fachen variiert. Aus den Werten von Tabelle 8 läßt sich kein Zusammenhang zwischen dem Abbau einzelner Aminosäurenreste und den reagierenden Radikalen erkennen.

Auch MEE L.K., ADELSTEIN S.J. und STEIN G. (4) fanden den Abbau von Met, Tyr und Phe bei Bestrahlung von RNase unter Zusatz von Radikalfängern (N_2O und t-Butanol). Aber auch hier ist kein Zusammenhang zwischen Menge der Einzelradikale und Aminosäurenabbau sichtbar.

Von SCHÜSSLER H. (61) wurde ebenfalls RNase unter N_2 , N_2O und unter Zusatz von 10^{-2} M Äthanol und 10^{-2} M t-Butanol bestrahlt. In Tabelle 9 werden die für RNase gefundenen Werte denen von LDH gegenübergestellt. Aber auch hier läßt sich keine Übereinstimmung bei den G-Werten für den Abbau von Met, Tyr, Phe und His erkennen. Dies kann möglicherweise an der Verschiedenheit der beiden Enzyme liegen. LDH hat mit 142000 ein 10fach höheres Molekulargewicht als RNase (14000), enthält im Gegensatz zu RNase Tryptophan und Cystein, besitzt jedoch keine Disulfidbrücken. In wie weit diese Unterschiede den strahleninduzierten Abbau einzelner Aminosäuren beeinflussen, darüber kann keine Aussage gemacht werden.

Bei Diskussionen über den Mechanismus der Strahleninaktivierung von Enzymen ist es von Interesse zu wissen, in wie weit der Abbau der Aminosäurenreste zum Verlust der biologischen Aktivität beiträgt. In zahlreichen Veröffentlichungen wurde auf einen Zusammenhang zwischen dem Abbau einer bestimmten Aminosäure und der Inaktivierung eines Enzyms hingewiesen. SMITH T.W. und ADELSTEIN S.J. (54) z.B. fanden, daß Veränderungen am Tyrosinrest zum Verlust der biologischen Aktivität der RNase führen, während

Tabelle 9:

Bestrahlungsbedingungen	Met		Tyr		Phe		His	
	LDH	RNase	LDH	RNase	LDH	RNase	LDH	RNase
N ₂ +Ath	0,45	0,11	0,15	0,20	0,07	+))	0,18	0,08
N ₂ +t-But	0,08	0,13	0,13	0,18	0,08	+))	0,10	0,10
N ₂ (KUNIGK)	0,41	0,13	0,14	0,30	0,12	0,03	0,34	0,07
N ₂ O	+))	0,11	0,15	0,25	0,15	0,06	0,25	0,12

+) Wert der bestrahlten LDH liegt nicht außerhalb der gegenseitigen 36-Grenze mit nativer LDH

Tabelle 10:

Bestrahlungsbedingungen	G-Werte der Inaktivierung	G-Werte für den Abbau von			
		Met	Tyr	Phe	His
N ₂ +Ath	0,034	0,45	0,15	0,07	0,18
N ₂ +t-But	0,047	0,08	0,13	0,08	0,10
N ₂ (KUNIGK)	0,053	0,41	0,14	0,12	0,34
N ₂ O	0,096	+))	0,15	0,15	0,25

+) Wert der bestrahlten LDH liegt nicht außerhalb der gegenseitigen 36-Grenze mit Nativer LDH

andere Autoren (55,56) die Zerstörung des Cystins dafür wichtiger halten. Beim Lysozym weisen ADAMS G.E. und (1) Mitarbeiter nach, daß eine Korrelation zwischen dem Abbau von Tryptophan und der Inaktivierung besteht.

Auf Grund der hier vorgelegten Ergebnisse der Aminosäurenanalyse von LDH, die unter verschiedenen Bedingungen strahleninaktiviert wurde, sollte untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen Abbau einer Aminosäure und der Inaktivierung der LDH besteht. In Tabelle 10 wurden den G-Werten für die Inaktivierung des Enzyms die G-Werte für den Abbau von Aminosäuren bei Bestrahlung von LDH unter verschiedenen Bedingungen gegenübergestellt. Dabei sind die G-Werte für die Inaktivierung ansteigend angeordnet. Keiner der G-Werte für den Abbau der Aminosäuren steigt in ähnlicher Weise an. Unter N_2O wurde der größte G-Wert für die Inaktivierung gemessen, aber die G-Werte für den Abbau der Aminosäuren sind nicht erhöht. Es kann aus diesen Werten kein Zusammenhang zwischen Aktivitätsverlust des Enzyms und Abbau einer bestimmten Aminosäure gesehen werden.

Auch bei den Untersuchungen an RNase unter ähnlichen Bedingungen, wie sie hier für LDH beschrieben wurden, wurde keine Korrelation des Abbaus einer Aminosäure zur Inaktivierung gefunden. Bereits 1967 konnten SCHÜSSLER H. und JUNG H. (57) zeigen, daß nach Bestrahlung und anschließender Gelchromatographie der RNase durch diese Bestrahlung in den enzymatisch aktiven Komponenten die

gleichen Aminosäuren verändert werden, wie in den inaktivierten Bestrahlungsprodukten. Sie zeigten also, daß bei RNase kein Zusammenhang zwischen Abnahme der Aktivität und Abbau einer bestimmten Aminosäure oder Aminosäurengruppe besteht.

Bei der Strahleninaktivierung von alkalischer Phosphatase konnten LYNN K.R. und SKINNER W.J. (62) keinen Zusammenhang zwischen Aktivitätsverlust und Zerstörung von Aminosäuren finden. Hier stand einer fast vollständigen Zerstörung des Tryptophans bei gleicher Dosis eine nur geringe Abnahme der Aktivität gegenüber. Ebenso wurden andere Aminosäuren wie Tyr, His und Met abgebaut, ohne bei gleicher Dosis eine vergleichbare Abnahme der Aktivität zu verursachen. LYNN und SKINNER sahen keinen Zusammenhang zwischen Aminosäurenabbau und Aktivitätsverlust, sondern nahmen an, daß die enzymatische Aktivität der alkalischen Phosphatase im Zusammenhang steht mit der Struktur des Metallatome enthaltenden Enzyms.

Da auch bei der Radiolyse von LDH Änderungen in der Aminosäurezusammensetzung vermutlich nicht der Grund für den Verlust der biologischen Aktivität sein können, muß man untersuchen, welche andere Änderung in der Molekülstruktur die Inaktivierung zur Folge haben könnte. Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, daß durch die Erhöhung der Ausbeute an $\text{OH}^\bullet$ -Radikalen die Strahleninaktivierung verstärkt ist, ohne daß der Abbau der Aminosäurenreste zunimmt.

LICHTIN N.N. und Mitarbeiter (47) gelang es 1972 durch Pulsradiolyse nachzuweisen, daß $\text{OH}^\bullet$ -Radikale die Peptidbindungen angreifen. So wäre eine Inaktivierung durch Aufspaltung der Peptidkette denkbar. NIEMCZYK P. (42) und PEUTEN M. (63) konnten nachweisen, daß die Bestrahlungsprodukte der LDH bei einer Restaktivität von etwa 20% fast nur noch aus Molekülbruchstücken, die kleiner als Untereinheiten der LDH sind, bestehen. Damit wurde nachgewiesen, daß der Bruch der Peptidkette eine wichtige Reaktion bei der Radiolyse der LDH ist. Ob diese Reaktion die Inaktivierung bedingt, ist der Gegenstand weiterer Untersuchungen.

5. Zusammenfassung

Lactatdehydrogenase wurde mit der Konzentration 1mg/1ml in 10^{-1} M Natriumphosphatpuffer pH=7,0 unter Zusatz verschiedener Radikalfänger durch Röntgenstrahlen inaktiviert. Dabei wurde die Abnahme der enzymatischen Aktivität in Abhängigkeit von der Strahlendosis gemessen. Hierbei wurde festgestellt, daß Zusatz von t-Butanol und Athanol zu einer Erhöhung des D_{37} -Wertes führt, Zusatz von N_2O diesen jedoch erniedrigt. Für die Inaktivierung des Enzyms wurden $OH^\bullet$ -Radikale als besonders wirkungsvoll gefunden. Nach Bestrahlungen der Lactatdehydrogenaselösungen, denen zum Teil Fängersubstanzen zugesetzt worden waren, mit 125-400 krd, wurden im Hydrolysat des bestrahlten Enzyms die Aminosäurezusammensetzung festgestellt. Die Aminosäureanalysen ergaben, daß unter allen untersuchten Bestrahlungsbedingungen die gleichen Aminosäurenreste abgebaut wurden, nämlich: Methionin, Tyrosin und Histidin. Für den Abbau einer bestimmten Aminosäure konnte kein bestimmtes Radikal als verantwortlich gefunden werden. Ebenso war es nicht möglich, einen Zusammenhang zwischen Abbau einer bestimmten Aminosäure und Enzymaktivitätsverlust zu finden, wie dies auch bei anderen Enzymen nicht gelang. So kann vermutet werden, daß der strahleninduzierte Aktivitätsverlust eines Enzyms nicht in der Änderung der Primärstruktur begründet ist, sondern daß dafür wohl $OH^\bullet$ -Radikale über Angriffe an den Peptidbindungen entscheidend sind.

6. Literaturverzeichnis

1. Adams G.E. : Int. J. Radiat. Biol. 16,333 (1969)
Willson R.L.
Aldrich J.E.
Cundall R.B.
2. Gorin G. : Int. J. Radiat. Biol. 15,33 (1969)
Papapavlou L.
Tai L.W.
3. Adams G.E. : Int. J. Radiat. Biol. 20,405 (1971)
Willson R.L.
Bisby R.H.
Cundall R.B.
4. Mee L.K. : Radiat. Res. 52,588 (1972)
Adelstein S.J.
Stein G.
5. Schüssler H. : Int. J. Radiat. Biol. 27,171 (1975)
6. Jaenicke R. : European J. Biochem. 4,157 (1968)
Knof S.
7. Jaenicke R. : Biochim. Biophys. Acta 85,186 (1964)
8. Müller E. : Dissertation, Erlangen (1973)
9. Di Sabato G. : Biochim. Biophys. Acta 77,135 (1963)
Pesce A.
Kaplan N.O.
10. Adams M.J. : Nature 227,1098 (1970)
Ford G.C. et al.
11. Jaenicke R. : European J. Biochem. 23,150 (1971)
Koberstein R.
Teuscher B.

12. Mire M. : Biochim. Biophys. Acta 181,35 (1969)
13. Fricke H. : Strahlentherapie 26,329 (1927)
- Petersen B.W.
14. Dale W.M. : Biochem. J. 36,80 (1942)
15. Dale W.M. : Brit. J. Radiol. Suppl. 1,46 (1947)
16. Dale W.M. : Phil. Trans. Roy. Soc. London,
Gray L.H. Ser. A242,33 (1949)
- Meredith W.J.
17. Dale W.M. : Radiat. Biol. 1,255 (1954)
18. Haber F. : Proc. Roy. Soc. London A147,332
Weiss J. (1934)
19. Weiss J. : Nature, London 153,748 (1944)
20. Weiss J. : Nature, London 157,584 (1946)
21. Weiss J. : Nature, London 186,751 (1960)
22. Hart E.J. : J. Amer. chem. Soc. 84,4090 (1962)
- Boag J.W.
23. Keene J.P. : Nature, London 197,47 (1963)
24. Fricke H. : J. chem. Physics 6,229 (1938)
- Hart E.J.
- Smith H.P.
25. Dale W.M. : Strahlenbiologie, Teil 1, herausge-
geben von A. Zuppinger, Springer-
Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg,
N. York (1966)
26. Determann H. : Gelchromatographie, Springer-Verlag
Berlin, Heidelberg, N. York (1967)
27. Informationsschrift: Sephadex- Gelfiltration in Theorie u.
Praxis d. Fa. Pharmacia,Uppsala (1969)

28. Wieland T. : Biochem. Z. 332,1 (1959)
Pfleiderer G.
Haupt J.
Wörner W.
29. Kunigk K. : Dissertation, Erlangen (1973)
30. Warburg O. : Biochem. Z. 286,81 (1936)
Christian W.
31. Kubowitz F. : Biochem. Z. 314,94 (1943)
Ott P.
32. Bergmeyer H.O. : Methoden der enzym. Analyse, Bd.1,
Verlag Chemie, Weinheim (1970)
33. Werner E. : Dissertation, Erlangen (1973)
34. Denkl C.P. : Dissertation, Erlangen (1971)
35. Squires G.L. : Meßergebnisse und ihre Auswertung,
Verlag W. de Gruyter, Berlin,
N. York (1971)
36. Blackburn S. : Amino acid determination, methods
and techniques, Marcel Dekker Inc.,
N. York (1968)
37. Wieland T. : Ang. Chem., Int. Edition Engl.
Pfleiderer G. 1,169 (1962)
38. Pesce A. : J. Biol. Chem. 242,2159 (1967)
Fondy Th.P.
Stolzenbach F.
Castillo F.
Kaplan N.O.

39. Hirs C.H.W. : J. Biol. Chem. 211,941 (1954)
Moore St.
Stein W.H.
40. Spackmann D.H. : Analyt. Chemie 30,1190 (1958)
Stein W.H.
Moore St.
41. Rappoport S.M. : Medizinische Biochemie, Verlag
Volk und Gesundheit, Berlin (1969)
42. Niemczyk P. : Dissertation, Erlangen (1974)
43. Henglein A. : Einführung in die Strahlenchemie,
Schnabel W. Verlag Chemie, Weinheim (1969)
Wendenburg J.
44. Draganic J.G. : The Radiation Chemistry of Water,
Academic Press, N. York and
London (1971)
45. Sortner S. : J. Chem. Phys. 37,2488 (1962)
Ottolenghi S.
Rabani S.
Stein G.
46. Lichtin N.N. : Biochim. Biophys. acta 263, 14(1972)
Ogdan S.
Stein G.
47. Lichtin N.N. : Biochim. Biophys. acta 276, 124 (1972)
Ogdan S.
Stein G.

48. Anbar M. : Int. J. of Applied Radiation and
Neta P. Isotopes, Vol.18, p.p. 493-523,
Pergamon Press Ltd. Northern
Ireland (1967)
49. Anbar M. : U.S. Department of Commerce,
Bambenek M. NSRDS-NBS43 (1973)
Ross A.B.
50. Dorfman L.M. : U.S. Department of Commerce,
Adams G.E. NSRDS-NBS46 (1973)
51. D'Ans-Lax : Taschenbuch f. Chemiker und Physiker,
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg,
N. York (1967)
52. Roberts P.B. : Int. J. Radiat. Biol. 24,143 (1973)
53. Schüssler H. : Unveröffentlichte Mitteilungen
Mee L. K.
Adelstein S.J.
54. Smith T.W. : Radiat. Res. 24,119 (1965)
Adelstein S.J.
55. Hayden G.A. : Radiat. Res. 22,130 (1964)
Friedberg F.
56. Slobodian E. : Biochemistry 5,2192 (1966)
Fleischer M.
57. Schüssler H. : Z. Naturforschung 22 b, 614 (1967)
Jung H.
58. Jung H. : Stud. biophys. Berlin 7,23 (1968)
Schüssler H.

59. Braams R. : Radiat. Res. (ed Silini) S.371,
North-Holland, Amsterdam (1967)
60. Shapira R. : Science 162,1489 (1968)
Stein G.
61. Schüssler H. : Unveröffentlichte Mitteilungen
62. Lynn K.R. : Radiat. Res. 57,358 (1974)
Skinner W.J.
63. Peuten M. : Unveröffentlichte Mitteilungen

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Pauly möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und die großzügige materielle Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit recht herzlich danken.

Frau Dr. H. Schüßler, die diese Arbeit mit viel Hilfsbereitschaft betreut und stets für alle Fragen Zeit und aufmunternden Rat gehabt hat, bin ich zu besonders herzlichem Dank verpflichtet.

Weiterhin danke ich den Herrn Dipl.-Physikern Dr. Schmidt und Dr. Milbers für die Durchführung der Dosismessung.

Lebenslauf

Am 6.8.1946 wurde ich, Reinhard Matthäus Offinger, als Sohn des Behördenangestellten Matthäus Offinger und seiner Ehefrau Walburga, geb. Schwenk, in Augsburg geboren. Dort besuchte ich die Volksschule und anschließend das Hum. Gym. bei St. Stephan, wo ich im Juni 1966 die Reifeprüfung ablegte. Nach Dienst beim Bundesgrenzschutz begann ich im Wintersemester 67/68 an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg mit dem Studium der Zahnmedizin. Nach krankheitsbedingter Unterbrechung unterzog ich mich im März 1971 der zahnärztlichen Vorprüfung. Mit dem Staatsexamen im Dezember 1973 schloß ich das Studium der Zahnmedizin ab. Seit August 1975 bin ich als Assistenzzahnarzt in einer zahnärztlichen Praxis tätig.

Erlangen, im Juli 1976

Reinhard Matthäus Offinger

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hegl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990